

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590740

研究課題名（和文）ポルトンメトリー法による脳虚血再灌流誘導ドパミン、セロトニン受容体機能変化の検討

研究課題名（英文）Forensic studies of brain vulnerability and resistance to ischemia

研究代表者

吉本 寛司（YOSHIMOTO KANJI）

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70111903

研究成果の概要（和文）：

生理学的条件下での各脳部位の DA 及び 5-HT 放出動態：生理的条件下における各脳部位の DA 及び 5-HT 放出量（動態）を検討した。DA 放出においては、各部位の特色を示し、特に LH 及び ACC の DA 放出量の多いことが認められた。一方、5-HT 放出は、各部における著明な相異は認められず、セロトニン神経系の略均一分布を反映している。虚血再灌流モデル動物の K⁺刺激による DA 及び 5-HT 放出変化：虚血再灌流モデルの DA 及び 5-HT 放出を検討した。再灌流群の K⁺刺激による ACC DA 放出変化は、sham 対照群に比べて著しい増加反応を示した。FC DA 放出は、同様わずかな増加を示した。一方、LH DA 放出は、sham 対照群に比べて低下抑制傾向が認められた。5-HT 放出動態変化については、ACC、LH 及び ACC 各脳部位において再灌流群と sham 群 2 群間に差は認められなかった。虚血再灌流障害（遅延性神経障害）は側坐核及び一部皮質 DA 神経に著明に認められた。セロトニン神経系はドパミン神経系に比較して虚血抵抗性を示した。脳部位選択的脆弱性は、経過時間の影響を加え各神経系により大きく異なることが示唆された。追加参考実験：ロテノン投与による虚血モデルにおいて、ロテノン処置によるチロシン水酸化酵素免疫細胞の減少を伴う側坐核ドパミン及びセロトニン量減少を確認し、アルコール嗜好性の増加を認めた。脳機能障害において脳報償系補完作用と飲酒増加の関連性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we used *in vivo* brain microdialysis to examine the effects of stimulations of ischemia and/or potassium on the release of dopamine (DA) and serotonin (5-HT) in the nucleus accumbens (ACC) of anesthetized rats. Ischemia (Four vessels occlusion: 4VO) for 10 min increased DA and 5-HT release in the ACC 200-fold and 15-fold, respectively, in the first experiment. In second experiment, releases of DA and 5-HT in the ACC increased 350-400% and 150-180% by first and second K⁺ stimulation, respectively, in the K⁺-K⁺ group. The 4VO treatment induced significant and massive increases of DA and 5-HT releases in the ACC, following K⁺ stimulation increased 5-HT release significantly in the Ischemia-K⁺ group compared with the K⁺-K⁺ group. Although second K⁺ stimulation increased DA release in the both group, but it was not significant changes in DA releases. K⁺-induced ACC 5-HT release was higher in the ischemia-treated rats than non ischemia-treated rats. Different brain vulnerability was shown in the dopaminergic and serotonergic neurons in the ACC

following the ischemic treatment. These findings suggested that the mesolimbic neurons indicated a resistance to dysfunction associated with 10 min-ischemia and maintained neural function, monoamine synthesis and neurotransmitter releases, within the transient neural damage. Supplement data: The mice treated with rotenone showed increases in alcohol drinking behavior. Levels of DA and 5-HT in the ACC and C/P of chronic rotenone-treated mice were decreased, while the ratios of DOPAC to DA in the ACC and C/P and of 5HIAA to 5-HT in the ACC, C/P and DRN were increased significantly. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity of chronic rotenone-treated mice (10 mg/kg, p.o.) slightly were decreased in both the striatum and the substantia nigra. Ethanol and acetaldehyde metabolism was not significantly different between mice treated with rotenone (10 mg/kg, p.o.) and controls. It was suggested that rotenone-treated mice had increased alcohol drinking behavior associated with increases in the DA turnover ratios of ACC and striatum to compensate for the neural degeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：虚血・再灌流障害・ドパミン・セロトニン・ロテノン・アルコール医学

1. 研究開始当初の背景

局所を流れる血液が少なくなる虚血領域の細胞や組織（脳）は、酸素欠乏と栄養障害を示し、この酸素欠乏は ATP 産生の逸脱により重篤な不可逆的機能障害を生じる。また虚血に陥った脳細胞への血液再開に伴う再灌流は、細胞内 Ca²⁺イオンの流入等により障害が拡大する。この状態はいわゆる虚血再灌流障害である。今回、動物モデルを用いて虚血再灌流障害機序とその程度を脳神経化学的に検討する方法において、ボルタンメトリー法原理を応用した高感度電気化学検出器を用いた。各脳内アミン量、さらにそれらの放出動態変化を検討し、一連の実験の追加実験として、呼吸鎖電子伝達系阻害剤ロテノンを用い脳障害（ドパミン神経系障害）とアルコ

ール行動変化（習慣飲酒の変化）の関係を検討したので報告する。

2. 研究の目的

脳虚血再灌流による遅発性神経細胞（死）障害は、脳部位により異なる選択的脆弱性を示す。この障害機序については、グルタミン酸-カルシウム仮説と併せて、病理組織学的に多数報告されている。今回、グルタミン酸-カルシウム仮説の下流機序となる各脳部位のドパミン (DA) とセロトニン (5-HT) 放出動態変化から虚血再灌流障害（脆弱性と抵抗性の部位相違）の本態についてボルタンメトリー法を応用した高感度電気化学検出器 (ECD) を用いて再検討した。

3. 研究の方法

生理学的条件下での各脳部位の DA 及び 5-HT 放出動態：脳微小透析膜プローブガイドカニューレを Wistar 系雄ラット (8 wks) の皮質 (FC)、腹内側核 (VMH)、視床下部外側野 (LHA)、中脳正中灰白質 (PAG) 及び側坐核 (ACC) に埋入手術を行い固定した。4～7 日後、術後回復良好な個体を用い、脳微小透析膜プローブを挿入し、各部位における DA 及び 5-HT 放出量 (fmol/min) を HPLC-ECD を用いて高感度分析を行った。虚血再灌流モデル動物の K⁺刺激による DA 及び 5-HT 放出変化：上記の結果により、測定脳部位を LHA, ACC 及び FC とした。実験 I の方法に準じて、LHA, ACC 及び FC に脳透析膜ガイドカニューレを挿入し、術後良好な個体を虚血再灌流モデルとした。4 血管閉塞法 (Pursinelli 法) に準じて、椎骨動脈焼灼後両側総頸動脈をクリップにより 10 分間閉塞、再灌流したモデルを作成した。4 日後 40mM KCl を脳微小透析膜を介して、各脳部位を灌流刺激し、その DA 及び 5-HT 放出 (量) 動態を sham 対照群 (椎骨動脈焼灼と頸部切開のみ) と比較検討した。

4. 研究成果

生理的条件下における各脳部位の DA 及び 5-HT 放出量 (動態) を図 1 に示した。

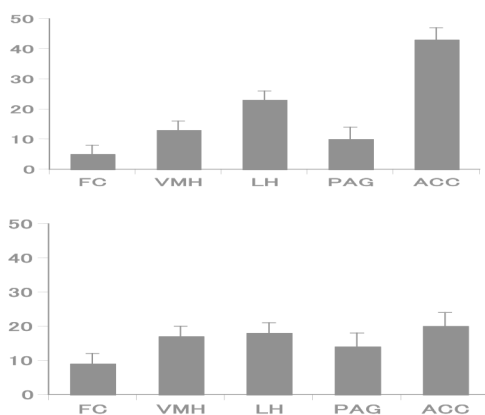


図 1 生理的ドパミン(上)、セロトニン(下)放出 (fmol/20 min)

DA 放出においては、各部位の特色を示し、特

に LH 及び ACC の DA 放出量の多いのが認められた。一方、5-HT 放出は、各部における著明な相異は認められず、セロトニン神経系の略均一分布を反映している。

虚血再灌流モデルの DA 放出は図 2 に示した。

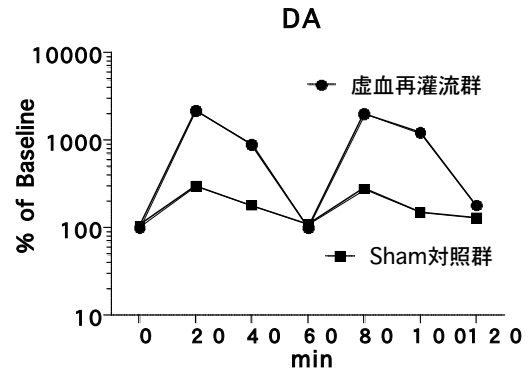


図 2 側坐核 (ACC) ドパミン放出変化 (0-20, 60-80 min K⁺刺激)

再灌流群の K⁺刺激による ACC DA 放出変化は、sham 対照群に比べて著しい増加反応を示した。同様に FC DA 放出は、同様わずかな増加を示した。一方、LH DA 放出は、sham 対照群に比べて低下抑制傾向が認められた。

5-HT 放出動態変化については、ACC, LH 及び ACC 各脳部位において再灌流群と sham 群 2 群間に差は認められなかった (図 3)。

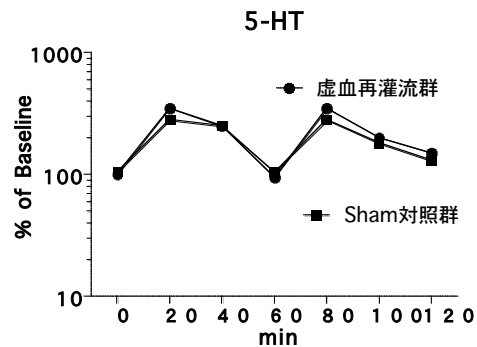


図 3 側坐核 (ACC) セロトニン放出変化 (0-20, 60-80 min K⁺刺激)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Tanaka M, Watanabe Y and Yoshimoto K: Regulation of relaxin 3 gene expression via cAMP-PKA in a neuroblastoma cell line. *Journal of Neuroscience Research* 87: 820-829 (2009)
[DOI:10.1002/jnr.21895](https://doi.org/10.1002/jnr.21895)
- ② Yoshimoto K, Hori M, Shinmen N, Kakiuchi K, Kato H, Sakabe M, Ikegaya H: Forensic studies of brain vulnerability and resistance: Ischemia-induced dopamine and serotonin releases in the rat nucleus accumbens. *Legal Medicine* 11: S279-S281 (2009)
[DOI:10.1016/j.legamed.2009.02.041](https://doi.org/10.1016/j.legamed.2009.02.041)
- ③ Isoda K, Morimoto M, Matsui F, Hasegawa T, Tozawa T, Morioka S, Chivonobu T, Nishimura A, Yoshimoto K and Hosoi H: Postnatal changes in serotonergic innervation to the hippocampus of methyl-CpG-binding protein 2-null mice. *Neuroscience* 165: 1254-1260 (2010)
[DOI:10.1016/j.neuroscience.2009.11.036](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.11.036)
- ④ Mastui F, Morimoto M, Yoshimoto K, Nakatomi Y, Svoji H, Nishimura A, Isoda K, Tanda K and Hosoi H. Effects of stress of postnatal development on corticosterone, serotonin and behavioral changes. *Brain Dev* 32(7) 517-522 (2010)
[DOI:10.1016/j.braindev.2009.09.001](https://doi.org/10.1016/j.braindev.2009.09.001)
- ⑤ Hioki C, Yoshida T, Kogure A, Yoshimoto K and Shimatsu A: Growth hormone administration control body composition associated with changes of thermogenesis in obese KK-Ay mice. *The Open Endocrinology Journal* 4: 3-8 (2010)
- ⑥ Kato H, Yoshimoto K, Kobayashi M, Sakabe M, Funakai H and Ikegaya H: Oral administration of ethanol with aspirin increases the concentration of salicylic acid in plasma and organs, especially the brain in mice. *Eur J Pharmacol* 635: 184-187 (2010)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.02.046>
- ⑦ Nakamura K, Itoho K, Yoshimoto K, Sugimoto T and Fushiki S: Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters brain monoamine concentration in adult mice. *Neuroscience Letters* 484: 66-70 (2010)
[DOI:10.1016/j.neulet.2010.08.021](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.021)
- ⑧ Kato H, Yoshimoto K, Ikegaya H: Two cases of oral aspirin over doses. *J Forensic and Legal Med.* 17:280-282 (2010)
- ⑨ Ishikawa N, Hara J, Takasaka T, Kobayashi M, Yoshimoto K and Ikegaya H: Age estimation using cytochrome c oxidase activity analysis. *Forensic Sci Int.* 209(1-3): 48-52 (2011)
[DOI:10.1016/j.forsciint.2010.12.006](https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.12.006)
- ⑩ Nishimura K, Inoue T, Yoshimoto K, Taniguchi T, Kitamura Y and Agata K: Regeneration of dopaminergic neurons after 6-hydroxydopamine-induced lesion in planarian brain. *J. Neurochem.* 119:

1217-1231 (2011)

DOI:10.1111/j.1471-4159.2011.07518.x

- ⑪ Matsumoto Y, Murakami H, Hattori N, Yoshimoto K, Asano S and Inden M: Excessive expression of hippocampal ezrin is induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. Biol. Pharm. Bull. 34: 1753-8 (2011)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2204089>

- ⑫ Yoshimoto K, Kitamura Y, Inden M, Hattori H, Ikegaya H: Administration of rotenone enhanced voluntary alcohol drinking behavior in C57BL/6J mice. Legal Medicine
<http://dx.doi.org/10.1016/j.legalmed.2012.03.005>

[学会発表] (計 2 件)

- ① K. Yoshimoto, M. Tanaka, Y. Watanabe, A. Komatsu, H. Ikegaya, S. Ueda: Increases of alcohol drinking behavior associated with serotonin 2c receptor function in the nucleus accumbens and dorsal raphe nucleus. 39th Annual Meeting Society for Neuroscience, Chicago, USA October 17-22 (2009)
- ② Yoshimoto K, Watanabe Y, Tanaka M, Ikegaya H and Kimura M.: Increased voluntary alcohol drinking behavior at the primary withdrawal stage is associated with the role of serotonin 2c receptors in alcohol vapor-exposed C57BL/6J. International Society for Biomedical Research on Alcoholism. 2010 ISBRA World Congress September 13 - 16, 2010 Paris, France, 100A, P042, Alcoholism Clinical and Experimental Research, Supplement 34(8) (2010)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 寛司 (YOSHIMOTO KANJI)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号 : 70111903

(2) 研究分担者

西村 陽 (NISHIMURA AKIRA)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号 : 00360040

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :